

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

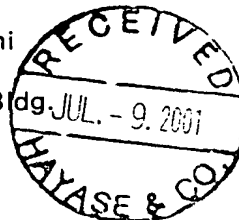
NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HAYASE, Kenichi
Hayase & Co.
8F, Esaka ANA Bldg.
17-1, Enoki-cho
Suita-shi
Osaka 564-0053
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 28 June 2001 (28.06.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P25550-PO	International application No. PCT/JP01/04649

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD. (for all designated States except US)
TAKAHASHI, Mie et al (for US)

International filing date : 01 June 2001 (01.06.01)
Priority date(s) claimed : 01 June 2000 (01.06.00)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 15 June 2001 (15.06.01)
List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR
National : CN, JP, KR, US

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>Y. KUWAHARA</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HAYASE, Kenichi
Hayase & Co.
8F, Esaka ANA Bldg.
17-1, Enoki-cho
Suita-shi
Osaka 564-0053
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 29 August 2001 (29.08.01)	
Applicant's or agent's file reference P25550-PO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP01/04649	International filing date (day/month/year) 01 June 2001 (01.06.01)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 01 June 2000 (01.06.00)
Applicant MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
01 June 2000 (01.06.00)	2000-164990	JP	20 July 2001 (20.07.01)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Khemais BRAHMI

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
THE FILING OF AMENDMENTS OF THE CLAIMS**
(PCT Administrative Instructions, Section 417)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HAYASE, Kenichi
Hayase & Co.
8F, Esaka ANA Bldg.
17-1, Enoki-cho
Suita-shi
Osaka 564-0053
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 11 October 2001 (11.10.01)	
Applicant's or agent's file reference P25550-PO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP01/04649	International filing date (day/month/year) 01 June 2001 (01.06.01)
Applicant MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD. et al	

1. The applicant is hereby notified that amendments to the claims under Article 19 were received by the International Bureau on:

04 October 2001 (04.10.01)

2. This date is within the time limit under Rule 46.1.

Consequently, the international publication of the international application will contain the amended claims according to Rule 48.2(f), (h) and (i).

3. The applicant is reminded that the international application (description, claims and drawings) may be amended during the international preliminary examination under Chapter II, according to Article 34, and in any case, before each of the designated Offices, according to Article 28 and Rule 52, or before each of the elected Offices, according to Article 41 and Rule 78.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colmbettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorised officer</p> <p>Y. KUWAKURA</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

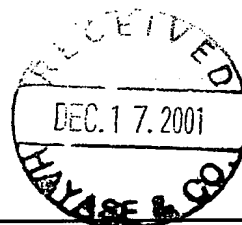
PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

HAYASE, Kenichi
Hayase & Co.
8F, Esaka ANA Bldg.
17-1, Enoki-cho
Suita-shi
Osaka 564-0053
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 06 December 2001 (06.12.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference P25550-PO			
International application No. PCT/JP01/04649	International filing date (day/month/year) 01 June 2001 (01.06.01)	Priority date (day/month/year) 01 June 2000 (01.06.00)	
Applicant MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has **communicated**, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:
KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
CN,EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 06 December 2001 (06.12.01) under No. WO 01/92886

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.91.11
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A brief statement on the basis of Article 19(1)

Claim 10 clarifies that cell components shrink to optimal sizes, whereby the cell component separation efficiency can be increased.

Cited reference (JP1-262470) is characterized in that when specific components in blood including erythrocytes are quantitatively analyzed, a porous development layer includes a specific quantity of sodium chloride or potassium chloride. Cited reference (JP6-94718) is characterized in that a development support in which cell components and liquid components have different development rates is employed. Cited reference (JP11-505327) is characterized in that a pad made of a porous material, which permeates a liquid part of blood but can complement cell components of the blood is included.

The present invention is different from the cited references in that cell components in an added liquid specimen shrink by contact with a cell shrinkage reagent carried on a biosensor. That is, the present invention obtains the effect that even when whole blood or a bacteria solution is a sample, cell components can penetrate a chromatographic carrier efficiently and sufficiently without adding a development solution.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

AMENDED CLAIMS

10.(Added) The biosensor of Claim 1 wherein
the concentration of the cell shrinkage reagent is 0.05
~ 5.0M.

11.(Amended) The biosensor of Claim 1 wherein
the biosensor is a one-step immunochromatographic test
strip.

12.(Amended) The biosensor of Claim 1 wherein
the biosensor is a dry analytical element.

13.(Amended) A blood component analytical method in which a
biosensor that is made of a single layer or plural layers of
a porous material, said biosensor having a reagent holding part
and utilizing chromatography is employed, wherein

cell components shrink and the shrunk cell components are
separated in an area of at least part of the reagent holding
part, or at least part of a chromatographically developed part
that is upstream of the reagent holding part, on which a cell
shrinkage reagent is carried.

14.(Amended) The blood component analytical method of Claim
13 wherein

a blood specimen to be added is whole blood.

15.(Amended) The blood component analytical method of Claim
13 wherein

the cell shrinkage reagent is inorganic salt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16.(Amended) The blood component analytical method of Claim 13 wherein

the cell shrinkage reagent is amino acid.

17.(Amended) The blood component analytical method of Claim 13 wherein

the cell shrinkage reagent is saccharide.

18.(Amended) The blood component analytical method of Claim 13 wherein

a carrier that carries the cell shrinkage reagent is dried naturally or dried by air-drying.

19.(Amended) The blood component analytical method of Claim 13 wherein

a carrier that carries the cell shrinkage reagent is dried by freeze-drying.

20.(Amended) The blood component analytical method of Claim 13 wherein

a carrier that carries the cell shrinkage reagent is dried by heat drying.

21.(Amended) The blood component analytical method of Claim 13 wherein

the concentration of the cell shrinkage reagent is 0.05 ~ 0.3M.

22.(Amended) The blood component analytical method of Claim 13 wherein

the biosensor is a one-step immunochromatographic test

THIS PAGE BLANK (USPTO)

strip.

23.(Amended) The blood component analytical method of Claim 13 wherein

the biosensor is a dry analytical element.

24.(Amended) A blood component analytical method in which a biosensor that is made of a single layer or plural layers of a porous material, said biosensor having a reagent holding part and utilizing chromatography is employed, wherein

cell components shrink or shrink while being chromatographically developed in a state where shrunk cell components are mixed, in an area of at least part of the reagent holding part, or at least part of a chromatographically developed part that is upstream of the reagent holding part, on which a cell shrinkage reagent is carried.

25.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

a blood specimen to be added is whole blood.

26.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

the cell shrinkage reagent is inorganic salt.

27.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

the cell shrinkage reagent is amino acid.

28.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the cell shrinkage reagent is saccharide.

29.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

a carrier that carries the cell shrinkage reagent is dried naturally or dried by air-drying.

30.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

a carrier that carries the cell shrinkage reagent is dried by freeze-drying.

31.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

a carrier that carries the cell shrinkage reagent is dried by heat-drying.

32.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

the concentration of the cell shrinkage reagent is 0.1 ~ 5.0M.

33.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

the biosensor is a one-step immunochromatographic test strip.

34.(Amended) The blood component analytical method of Claim 24 wherein

the biosensor is a dry analytical element.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

上記細胞収縮剤を担持する担体を、熱乾燥によって乾燥させた、
ことを特徴とするバイオセンサ。

1 0. (追加) 請求の範囲第 1 項に記載のバイオセンサにおいて、
上記細胞収縮剤の濃度が、0. 0 5 ~ 5. 0 Mである、

5 ことを特徴とするバイオセンサ。

1 1. (補正後) 請求の範囲第 1 項に記載のバイオセンサにおいて、
上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片である、
ことを特徴とするバイオセンサ。

1 2. (補正後) 請求の範囲第 1 項に記載のバイオセンサにおいて、

10 上記バイオセンサが乾式分析要素である、
ことを特徴とするバイオセンサ。

1 3. (補正後) 単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を
有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサを用いる血液成分分析方法にお
いて、

15 上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上
流側の少なくとも一部の、細胞収縮剤を担持した領域で細胞成分を収縮させ、収
縮した細胞成分を分離する、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

1 4. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
20 添加する血液試料は、全血である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

1 5. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、無機塩である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

25 1 6. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、アミノ酸である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

1 7. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、糖類である、

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ことを特徴とする血液成分分析方法。

1 8. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

5 1 9. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、凍結乾燥によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

2 0. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、熱乾燥によって乾燥させる、

10 ことを特徴とする血液成分分析方法。

2 1. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤の濃度は、0. 0 5～0. 3 Mである、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

15 2 2. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

2 3. (補正後) 請求の範囲第 1 3 項に記載の血液成分分析方法において、
上記バイオセンサが乾式分析要素である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

20 2 4. (補正後) 単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を
有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサを用いる血液成分分析方法にお
いて、

上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上
流側の少なくとも一部の、細胞収縮剤を担持した領域で細胞成分を収縮させある

25 いは収縮しながら、収縮した細胞成分が混在する状態でクロマト展開する、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

2 5. (補正後) 請求の範囲第 2 4 項に記載の血液成分分析方法において、
添加する血液試料は、全血である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、無機塩である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
27. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
5 上記細胞収縮剤は、アミノ酸である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
28. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、糖類である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
- 10 29. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
30. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、凍結乾燥によって乾燥させる、
15 ことを特徴とする血液成分分析方法。
31. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、熱乾燥によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
32. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
20 上記細胞収縮剤の濃度は、0.1～5.0Mである、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
33. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
- 25 34. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記バイオセンサが乾式分析要素である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

条約19条(1)に基づく説明書

請求の範囲第10項は、細胞成分を最適な大きさに収縮させることによって、細胞成分分離効率を向上させることができることを明確にした。

- 5 引用例(JP1-262470)は、赤血球を含む血液中の特定成分を定量分析する際に、特定量の塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを多孔質展開層に含むことを特徴とし、引用例(JP6-94718)は、細胞成分と液性成分の展開速度が相異なる展開支持体を用いたことを特徴とし、引用例(JP11-505327)は、血液の液体部分を透過するが血液の細胞成分を補足することができる多孔性物質製のパッドを備えたことを特徴とする。
- 10

本発明は、添加された液体試料中の細胞成分が、バイオセンサに担持した細胞収縮剤と接触することによって収縮される点で、上記引用例とは異なる。すなわち、本発明は、全血や細菌溶液を検体としても、クロマト担体上を細胞成分が効率よく、かつ、展開溶液を加えなくとも十分に浸透することができる効果を得る。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 書類記号 P25550-PO	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO1/04649	国際出願日 (日.月.年) 01.06.01	優先日 (日.月.年) 01.06.00
出願人(氏名又は名称) 松下電器産業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。 ☐ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543, 31/22, 30/88

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543, 31/22, 30/88

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1992-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 1-262470 A (富士写真フィルム株式会社) 19. 10月. 1989 (19. 10. 89) (ファミリーなし)	1-33
A	JP 6-94718 A (株式会社第一ラジオアイソトープ研究 所) 8. 4月. 1994 (08. 04. 94) (ファミリーなし)	1-33
A	JP 11-505327 A (スミスクライン ダイアグノステ ィックス インコーポレイテッド) 18. 5月. 1999 (18. 05. 99) & EP 832430 A	1-33

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 07. 01

国際調査報告の発送日

07.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2 J 9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年12 月6 日 (06.12.2001)

PCT

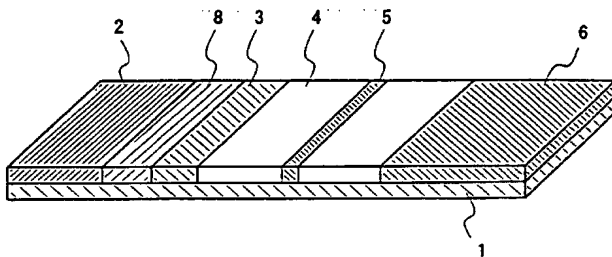
(10) 国際公開番号
WO 01/92886 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/543, 31/22, 30/88 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04649 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋三枝 (TAKA-HASHI, Mie) [JP/JP]; 〒792-0026 愛媛県新居浜市久保田町2-13-1 Ehime (JP). 難岡正剛 (NADAOKA, Masataka) [JP/JP]; 〒799-3113 愛媛県伊予市米湊819-5 Ehime (JP). 田中宏橋 (TANAKA, Hirotaka) [JP/JP]; 〒791-1102 愛媛県松山市来住町533-1-102 Ehime (JP). 北脇文久 (KITAWAKI, Fumihisa) [JP/JP]; 〒571-0064 大阪府門真市御堂町25-3 松幸寮211 Osaka (JP).
(22) 国際出願日: 2001 年6 月1 日 (01.06.2001)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願2000-164990 2000 年6 月1 日 (01.06.2000) JP (74) 代理人: 弁理士 早瀬憲一 (HAYASE, Kenichi); 〒564-0053 大阪府吹田市江の木町17番1号 江坂全日空ビル8階 早瀬特許事務所 Osaka (JP).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒571-8501 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka (JP). (81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.

[続葉有]

(54) Title: BIOSENSOR AND BLOOD COMPONENT ANALYZING METHOD

(54) 発明の名称: バイオセンサ、及び血液成分分析方法



(57) Abstract: A biosensor comprising, as shown in Figure 1, a single or multiple layers of a porous material, having a reagent holding portion, and using chromatography, in which at least part of the reagent holding portion or at least part on the upstream side of the reagent holding portion toward the chromatograph carries a cell contracting agent. A blood component analyzing method is also disclosed. By using such a biosensor and by the blood component analyzing method, the cost is low, and the blood component analysis is conducted simply, quickly, and precisely even if whole blood is used as a specimen.

(57) 要約:

この発明に係るバイオセンサ、及び血液成分分析方法は、第1図に示すように、単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサにおいて、試薬保持部位の少なくとも一部、または試薬保持部位よりもクロマト上流側の少なくとも一部に、細胞収縮剤を担持するようにしたものである。

このような構成のバイオセンサ、及び血液成分分析方法では、全血を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行うことができる。



WO 01/92886 A1



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

— 補正書・説明

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

バイオセンサ、及び血液成分分析方法

5 技術分野

本発明は、血液成分を分析するバイオセンサ、及び血液成分分析方法に関し、特に、血球等の細胞成分の影響を低減し、微量の検体量で簡便かつ迅速で高精度な測定が可能なバイオセンサ、及び血液成分分析方法に関するものである。

10 背景技術

人の健康状態を診断する手段として、血液の生化学的検査は広く実施されている。そして、血液中の構成成分である代謝産物、タンパク質、脂質、電解質、酵素、抗原、抗体等の種類や濃度は、全血のまま測定することが困難であり、通常、全血を遠心分離して得られる血漿または血清を検体として測定されている。

- 15 ところが、遠心分離には手間と時間とがかかり、特に少数の検体を緊急に処理したいときや、現場検査等には、遠心分離機を必要とする遠心法は不向きである。また、遠心分離して得られる血清量もしくは血漿量は、採血により得られた血液量に対して少量である。

- そこで、全血を検体としても血球等の細胞成分の影響を受けない血液成分分析方法として、例えば、特開昭57-53661号公報、及び特開平8-54387号公報に示されるような、平均直径が0.2～5 μ mで密度が0.1～0.5 g/cm³のガラス繊維濾紙を用いて血液を滲み出させ、血漿や血清を分離する血球分離方法を用いる血液成分分析方法や、特開平9-196908号公報に示されるような、アミノ酸もしくは無機塩の水溶液を全血に混合した後に血球成分を
25 濾別することで、血球による濾過材料の目詰まりを回避し、より少量の血液を用いて、より大量の血漿または血清成分を得る血液調整方法を用いた血液成分分析方法が検討されてきた。

また、特開平9-72904号公報に示されるような、試験片上に担持した界面活性剤によって、血液を溶血させた後に展開溶液を用いて試験片上に検体溶液

を展開していく方法が検討されてきた。

- しかし、所定の密度のガラス繊維濾紙を用いる方法は、確かに血球分離効率は向上するものの、ほぼ完全に血球を分離するのに、かなりの時間を要するため迅速に測定できないという問題や、検査に必要な検体量を得るのに大量の血液が必要になるばかりでなく、血液の粘度やヘマトクリット値に個人差があるためにその分離能に個体差が生じてしまい測定精度が非常に低いという問題があった。また、特別な濾紙が必要になるためにコストがかかるという問題もあった。

- また、全血に一定濃度の無機塩またはアミノ酸の水溶液を添加した後に血球成分を濾別する方法は、遠心分離による血球分離の作業は省かれたものの、予め血液に添加液を加えて処理する作業が繁雑であるため、簡易性に欠けるばかりでなく測定に時間を要するという問題があった。

- 更に、血液を予め溶血させる方法において、溶血とは界面活性剤やサポニンなどの溶血剤を用いて、血球の細胞膜における脂質二重層を破壊し、血球細胞を粉碎するのが基本原理であり、極微量の血液であれば、溶血された後に展開溶液を添加することにより、クロマトデバイス上を展開していくことも可能であるが、展開溶液を用いない場合、細胞片が展開層に目詰まりしてしまうため、展開溶液なくして採血された血液検体を展開することは不可能であるという問題があった。

- 本発明は、上記のような課題を解決するためになされたものであり、全血を検体としても、コストがかからず、予め血液に何らかの処理を施す必要性や、検体溶液を展開するための展開溶液の必要性のない、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことのできるワンステップのバイオセンサ、及び血液成分分析方法を提供することを目的とする。

発明の開示

- 25 本発明（請求の範囲第1項）に係るバイオセンサによれば、単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサにおいて、上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上流側の少なくとも一部に、細胞収縮剤を担持したものである。

このような構成のバイオセンサでは、添加された液体試料中の細胞成分が、細

胞収縮剤と接触することによって収縮され、クロマト担体上を細胞成分が効率よく、かつ展開溶液を加えなくとも十分浸透することができ、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血や細菌溶液を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の分析を行なうことができる。なお、ここで示す細胞収縮とは、細胞の膜平衡の性質を利用し、細胞膜を通過可能な物質の高濃度状態下で細胞の浸透圧の作用により細胞を収縮させた状態を示し、細胞収縮剤とは、浸透圧の作用により細胞を収縮させる効果のある物質であることが好ましい。

- 5 示す細胞収縮とは、細胞の膜平衡の性質を利用し、細胞膜を通過可能な物質の高濃度状態下で細胞の浸透圧の作用により細胞を収縮させた状態を示し、細胞収縮剤とは、浸透圧の作用により細胞を収縮させる効果のある物質であることが好ましい。
- 10 この発明（請求の範囲第2項）は、請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、添加する液体試料が、全血であるものとした。

このような構成のバイオセンサでは、予め全血中の血球成分を取り除く作業をする必要がなくなり、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

- 15 この発明（請求の範囲第3項）は、請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、添加する液体試料が、細菌を含む溶液であるものとした。

このような構成のバイオセンサでは、予め細菌溶液中の細胞成分を取り除いたり、破碎する作業をする必要がなくなり、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の分析を行なうことができる。

- 20 この発明（請求の範囲第4項）は、請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、上記細胞収縮剤が、無機塩であるものとした。

- 25 このような構成のバイオセンサでは、添加された液体試料中の細胞成分が、無機塩と接触することによって収縮され、クロマト担体上を細胞成分が効率よく、かつ展開溶液を加えなくとも十分浸透することができ、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血や細菌溶液を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の分析を行なうことができる。

この発明（請求の範囲第5項）は、請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、上記細胞収縮剤が、アミノ酸であるものとした。

このような構成のバイオセンサでは、添加された液体試料中の細胞成分が、アミノ酸と接触することによって収縮され、クロマト担体上を細胞成分が効率よく、

かつ展開溶液を加えなくとも十分浸透することができ、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血や細菌溶液を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の分析を行なうことができる。

この発明（請求の範囲第6項）は、請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、上記細胞収縮剤が、糖類であるものとした。

このような構成のバイオセンサでは、添加された液体試料中の細胞成分が、糖類と接触することによって収縮され、クロマト担体上を細胞成分が効率よく、かつ展開溶液を加えなくとも十分浸透することができ、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血や細菌溶液を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の分析を行なうことができる。

この発明（請求の範囲第7項）は、請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、上記細胞収縮剤を担持する担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させるものとした。

このような構成のバイオセンサでは、細胞収縮剤の変性等が少なくなり、効率よく細胞成分を収縮させることができる。

この発明（請求の範囲第8項）は、請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、上記細胞収縮剤を担持する担体を、凍結乾燥によって乾燥させるものとした。

このような構成のバイオセンサでは、細胞収縮剤の結晶が、きめ細かく溶解しやすい状態となり、短時間で細胞成分を収縮させることができる。

この発明（請求の範囲第9項）は、請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、上記細胞収縮剤を担持する担体を、熱乾燥によって乾燥させるものとした。

このような構成のバイオセンサでは、短時間での細胞収縮剤の乾燥が可能となり、製造工程の簡易化が可能となる。

この発明（請求の範囲第10項）は、請求の範囲1項に記載のバイオセンサにおいて、上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片であるものとした。

このような構成のバイオセンサでは、全血などの細胞成分を含む液体試料を予

め前処理する必要性がなく、免疫反応を利用することで、測定対象に対する抗体あるいは抗原を入手することで広い分野における測定対象が測定でき、全血等の細胞成分を含む液体試料を用いた場合において、簡易迅速な測定が可能となる。

5 なお、ここで示すワンステップとは、その測定操作において、全血など細胞成分を含む液体試料の前処理を必要とせず、試験片に液体試料を点着するのみで、液体試料点着の前後に試験片上に液体試料とは異なる展開溶液を用いたり、B/F分離を目的とした洗浄操作を行う等を必要としない操作を示し、免疫クロマトグラフィ試験片とは、クロマト展開する担体上で、抗原抗体反応を利用して液体試料中の被検物質の検出を行うセンサを示す。

10 この発明（請求の範囲第1項）は、請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、上記バイオセンサが乾式分析要素であるものとした。

15 このような構成のバイオセンサでは、バイオセンサ全体が乾燥担体であることから、持ち運びが容易であるばかりでなく、保存環境や保存状態を厳密にする必要性がなく、取り扱いが容易で、保存条件を選ばない長期保存の可能なバイオセンサを提供することが可能となる。なお、ここで示す乾式分析要素とは、バイオセンサを構成する全ての部材及び担持された試薬が乾燥状態であるものを示す。

20 本発明（請求の範囲第2項）に係る血液成分分析方法によれば、単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサを用いる血液成分分析方法において、上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上流側の少なくとも一部の、細胞収縮剤を担持した領域で細胞成分を収縮させ、収縮した細胞成分を分離するものとした。

25 このような構成の血液成分分析方法では、展開溶液を加えなくとも十分に浸透することが可能となり、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

 この発明（請求の範囲第3項）は、請求の範囲第2項に記載の血液成分分析方法において、添加する血液試料は、全血であるものとした。

 このような構成の血液成分分析方法では、予め全血中の血球成分を取り除く作

業をする必要が無くなり、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

この発明（請求の範囲第14項）は、請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤が、無機塩であるものとした。

- 5 このような構成の血液成分分析方法では、展開溶液を加えなくとも十分に浸透することが可能となり、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

- 10 この発明（請求の範囲第15項）は、請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤が、アミノ酸であるものとした。

このような構成の血液成分分析方法では、展開溶液を加えなくとも十分に浸透することが可能となり、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

- 15 この発明（請求の範囲第16項）は、請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤が、糖類であるものとした。

このような構成の血液成分分析方法では、展開溶液を加えなくとも十分に浸透することが可能となり、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分

- 20 分析を行なうことができる。

この発明（請求の範囲第17項）は、請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤を担持した担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させるものとした。

- 25 このような構成の血液成分分析方法では、細胞収縮剤を担持した担体を安定した状態で乾燥することができるため、乾燥中の細胞収縮剤の変性等を抑えることができる。

この発明（請求の範囲第18項）は、請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤を担持した担体を、凍結乾燥によって乾燥させるものとした。

このような構成の血液成分分析方法では、細胞収縮剤の結晶がきめ細かく溶解しやすい状態になり、短時間で細胞成分を収縮させることができる。

この発明（請求の範囲第19項）は、請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤を担持した担体を、熱乾燥によって乾燥させるものとした。

このような構成の血液成分分析方法では、細胞収縮剤を担持した担体の乾燥時間が短くなり、短時間での細胞収縮剤の乾燥が可能となり、製造工程の簡易化が可能となる。

この発明（請求の範囲第20項）は、請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤の濃度が、0.05～0.3Mであるものとした。

このような構成の血液成分分析方法では、細胞成分を最適な大きさに収縮させることができ、この結果、細胞成分分離効率が向上するという効果がある。

この発明（請求の範囲第21項）は、請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片であることとした。

このような構成の血液成分分析方法では、全血の細胞成分を除くため予め遠心分離などの前処理をする必要性がなく、免疫反応を利用することで、測定対象に対する抗体あるいは抗原を入手することで広い分野における測定対象が測定でき、全血を用いた場合でも、微量の血液量で簡易迅速な測定が可能である。

この発明（請求の範囲第22項）は、請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、上記バイオセンサが乾式分析要素であることとした。

このような構成の血液成分分析方法では、バイオセンサ全体が乾燥担体であることから持ち運びが容易であるばかりでなく、保存環境や保存状態を厳密にする必要性がなく、取り扱いの容易な血液成分分析方法を提供することができる。

本発明（請求の範囲第23項）に係る血液成分分析方法によれば、単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサを用いる血液成分分析方法において、上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上流側の少なくとも一部の、

細胞収縮剤を担持した領域で細胞成分を収縮させ、収縮した細胞成分が混在する状態でクロマト展開するものである。

このような構成の血液成分分析方法では、クロマト担体上を目詰まりすることなく効率よく、かつ展開溶液を加えなくとも十分に浸透することが可能となり、

- 5 クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

この発明（請求の範囲第 2 4 項）は、請求の範囲第 2 3 項に記載の血液成分分析方法において、添加する血液試料は、全血であるものとした。

- 10 このような構成の血液成分分析方法では、予め全血中の血球成分を取り除く作業をする必要がなくなり、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

この発明（請求の範囲第 2 5 項）は、請求の範囲第 2 3 項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤は、無機塩であるものとした。

- 15 このような構成の血液成分分析方法では、クロマト担体上を目詰まりすることなく効率よく、かつ展開溶液を加えなくとも十分に浸透することが可能となり、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

- 20 この発明（請求の範囲第 2 6 項）は、請求の範囲第 2 3 項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤が、アミノ酸であるものとした。

このような構成の血液成分分析方法では、クロマト担体上を目詰まりすることなく効率よく、かつ展開溶液を加えなくとも十分に浸透することが可能となり、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血を検体としても、
25 コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

この発明（請求の範囲第 2 7 項）は、請求の範囲第 2 3 項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤が、糖類であるものとした。

このような構成の血液成分分析方法では、クロマト担体上を目詰まりすること

なく効率よく、かつ展開溶液を加えなくとも十分に浸透することが可能となり、クロマト下流側に流れる液体量が増加するようになり、全血を検体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

- 5 この発明（請求の範囲第28項）は、請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤を担持した担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させるものとした。

10 このような構成の血液成分分析方法では、細胞収縮剤を担持した担体を安定した状態で乾燥することができるため、乾燥中の細胞収縮剤の変性等を抑えることができる。

 この発明（請求の範囲第29項）は、請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤を担持した担体を、凍結乾燥によって乾燥させるものとした。

15 このような構成の血液成分分析方法では、細胞収縮剤の結晶がきめ細かく溶解しやすい状態になり、短時間で細胞成分を収縮させることができる。

 この発明（請求の範囲第30項）は、請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤を担持した担体を、熱乾燥によって乾燥させるものとした。

20 このような構成の血液成分分析方法では、細胞収縮剤を担持した担体の乾燥時間が短くなり、乾燥中の細胞収縮剤の変性等を抑えることができる。

 この発明（請求の範囲第31項）は、請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、上記細胞収縮剤の濃度が、0.1～5.0Mであるものとした。

25 このような構成の血液成分分析方法では、細胞成分を最適な大きさに収縮させることができ、この結果、全血を担体上で目詰まりすることなく浸透させることができる。

 この発明（請求の範囲第32項）は、請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片であることとした。

 このような構成の血液成分分析方法では、全血の細胞成分を除くため予め遠心

分離などの前処理をする必要性がなく、免疫反応を利用することで、測定対象に対する抗体あるいは抗原を入手することで広い分野における測定対象が測定でき、全血等の細胞成分を含む液体試料を用いた場合において、簡易迅速な測定が可能な血液成分分析方法を提供することができる。

- 5 この発明（請求の範囲第33項）は、請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、上記バイオセンサが乾式分析要素であることとした。

このような構成の血液成分分析方法では、バイオセンサ全体が乾燥担体であることから持ち運びが容易であるばかりでなく、保存環境や保存状態を厳密にする必要性がなく、取り扱いの容易な血液成分分析方法を提供することができる。

10

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の実施の形態1によるクロマトグラフィーを利用した横型バイオセンサを示す図である。

- 15 第2図は、本発明の実施の形態1による横型バイオセンサの、試料添加部を省いて、収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにしたものを示す図である。

第3図は、本発明の実施の形態2によるクロマトグラフィーを利用した縦型バイオセンサを示す分解斜視図である。

第4図は、本発明の実施の形態2による縦型バイオセンサを、試料添加部側からみた斜視図である。

- 20 第5図は、本発明の実施の形態2による縦型バイオセンサを、吸水部側からみた斜視図である。

第6図は、本発明の実施の形態2による縦型バイオセンサの試料添加部を省いて、収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにしたものを示す斜視図である。

- 25 第7図は、本発明の実施の形態2による縦型バイオセンサの試料添加部を省いて、収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにしたものを、収縮剤保持部位側からみた斜視図である。

第8図は、本発明の実施の形態2による縦型バイオセンサの試料添加部を省いて、収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにしたものを、吸水部側からみた斜視図である。

第9図は、本発明の実施例1による横型バイオセンサの、収縮剤濃度の変化による反応層上の溶液浸透速度を示す図である。

第10図は、本発明の実施例2による縦型バイオセンサの、収縮剤濃度の変化による反応層への血球付着率を示す図である。

5

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施の形態について、図面を参照しながら説明する。なお、ここで示す実施の形態はあくまでも一例であって、必ずしもこの実施の形態に限定されるものではない。

10 (実施の形態1)

第1図は、本実施の形態1によるクロマトグラフィーを利用した横型バイオセンサを示す図である。

第1図に示されるように、本実施の形態1によるバイオセンサは、吸収性の大きい不織布やガラス繊維濾紙等からなる、液体試料を添加または塗布するための試料添加部2と、細胞成分を収縮させる働きがある細胞収縮剤が、不織布やガラス繊維濾紙等に溶解可能に保持された収縮剤保持部位8と、分析対象物と何らかの反応を行なう標識試薬が、不織布やガラス繊維濾紙等に溶解可能に保持された標識試薬保持部位3と、ニトロセルロース等からなる反応層4と、反応層4の領域上に特異的タンパク質が固定化された特異的タンパク質固定化部5と、液体試料を最終的に吸収する吸水部6とが、プラスチック等からなる担体支持体1の上部に形成されている。

収縮剤保持部位8が保持する細胞収縮剤は、例えば、無機塩、アミノ酸、及び糖類等である。なお、ここで無機塩とは、塩化ナトリウムや塩化カリウム、リン酸ナトリウム等、塩を含む無機化合物を示す。また、ここでアミノ酸とは、グリシンやグルタミン酸等同一分子内にカルボキシル基とアミノ基とを有する化合物を示し、プロリンやヒドロキシプロリンのようなイミノ酸も含む。また、ここで糖類とは、グルコースやスクロース、トレハロース等の糖質や、グルシトール等の糖アルコールを示す。

また、分析対象物と標識試薬との何らかの反応とは、抗原抗体反応のようなり

ガンドとレセプターとの特異的結合反応、または酵素反応等の任意の特異的な反応を示す。

また、標識試薬保持部位 3 が保持する標識試薬は、金コロイド等の金属ゾルや、非金属ゾル、染料ゾル、着色粒子、色素、酵素、タンパク質等を示す。

- 5 次に、本実施の形態 1 によるバイオセンサを用いた血液成分分析方法について説明する。

まず、全血や細菌溶液等の細胞成分を含む液体試料が試料添加部 2 に添加され、この添加された液体試料が収縮剤保持部位 8 に達すると、収縮剤保持部位 8 に保持されている収縮剤が、液体試料の浸透により溶解され、細胞成分を収縮させる。

- 10 これにより、液体試料は、細胞成分が混在下状態でも、目詰まりを起こすことなくクロマト下流側に浸透していく。

次いで、収縮された細胞成分が混在する液体試料が、標識試薬保持部位 3 に達すると、標識試薬保持部位 3 に保持された標識試薬が、液体試料の浸透により溶解され、反応層 4 に浸透する。

- 15 そして、反応層 4 の領域上の特異的タンパク質固定化部 5 で、標識試薬保持部位 3 から溶出した標識試薬との反応が行なわれ、このとき、液体試料中に分析対象物が存在すれば、特異的タンパク質固定化部 5 に何らかの呈色反応が見られる。

最終的に、液体試料は吸水部 6 に吸収され反応は終了する。

- 20 このように、本実施の形態 1 によるバイオセンサ、及び血液成分分析方法によれば、収縮剤保持部位に保持された細胞収縮剤が、液体試料中の細胞成分を収縮させるようにしたので、細胞成分が混在した状態でも液体試料が目詰まりを起こすことなくクロマト下流側に浸透するようになり、全血や細菌溶液を検体としても、予め検体を前処理することなく展開することが可能であり、検体溶液をクロマト下流方向へ展開するための展開溶液を必要としないでよいために、コストが
25 かからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

なお、上記実施の形態 1 によるバイオセンサは、その試料添加部を省き、反応層に直接試料を添加する構成にしてもよい。

第 2 図は、本発明の実施の形態 1 による横型バイオセンサの、試料添加部を省いて、収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにしたものを示す図である。

第2図に示されるように収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにすることで、部材数、及び工程数を低減することができる。

また、上記実施の形態1によるバイオセンサは、複数の部材からなるものとしたが、これに限られるものではなく、収縮剤を溶解可能に保持した収縮剤保持領域と、
5 標識試薬を溶解可能に保持した標識試薬保持領域と、特異的タンパク質が固定化された特異的タンパク質固定化部とを、ニトロセルロース等の多孔質性材料からなる反応層に形成した単層の部材からなるものとしてもよい。

また、本発明のバイオセンサは乾式分析要素であってもよい。ここで示す乾式分析要素とは、バイオセンサを構成する全ての部材、及び担持された試薬が乾燥
10 状態であるものを示す。このように試験片を乾燥状態にすることにより、バイオセンサ全体が乾燥担体であることから、持ち運びが容易であるばかりでなく、保存環境や保存状態を厳密にする必要性がなく、取り扱いが容易で、保存条件を選ばない長期保存が可能である。

また、本発明のバイオセンサはワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片
15 を有するものであってもよい。ここで示すワンステップとは、その測定操作において、全血など細胞成分を含む液体試料の前処理を必要とせず、試験片に液体試料を点着するのみで、液体試料点着の前後に試験片上に液体試料とは異なる展開溶液を用いたり、洗浄操作を行うなどを必要としない操作を示し、免疫クロマトグラフィー試験片とは、クロマト展開する担体上で、抗原抗体反応を利用して液
20 体試料中の被検物質の検出を行うセンサを示す。このように試験片ををワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片とすることにより、全血などの細胞成分を含む液体試料を予め前処理する必要性がなく、免疫反応を利用することで、測定対象に対する抗体あるいは抗原を入手することで広い分野における測定対象が測定でき、全血等の細胞成分を含む液体試料を用いた場合において、簡易迅速な測
25 定が可能となる。

(実施の形態2)

第3図は、本発明の実施の形態2によるクロマトグラフィーを利用した縦型バイオセンサを示す分解斜視図である。

第3図に示されるように、本実施の形態2によるバイオセンサは、吸収性の大き

きい不織布やガラス繊維濾紙等からなる、液体試料を添加または塗布するための試料添加部 1 2 と、細胞成分を収縮させる働きがある細胞収縮剤が不織布やガラス繊維濾紙等に溶解可能に保持された収縮剤保持部位 1 8 と、分析対象物と何らかの反応を行なう標識試薬が、不織布やガラス繊維濾紙等に溶解可能に保持された標識試薬保持部位 1 3 と、ニトロセルロース等からなる反応層 1 4 と、反応層 1 4 の領域上に特異的タンパク質が固定化された特異的タンパク質固定化部 1 5 と、液体試料を最終的に吸収する吸水部 1 6 と、反応層 1 4 上の結果を見るための結果確認窓 1 9 とが積層されるように構成されている。

収縮剤保持部位 1 8 が保持する細胞収縮剤は、例えば、無機塩、アミノ酸、及び糖類等である。なお、ここで無機塩とは、塩化ナトリウムや塩化カリウム、リン酸ナトリウム等、塩を含む無機化合物を示す。また、ここでアミノ酸とは、グリシンやグルタミン酸等同一分子内にカルボキシル基とアミノ基とを有する化合物を示し、プロリンやヒドロキシプロリンのようなイミノ酸も含む。また、ここで糖類とは、グルコースやスクロース、トレハロース等の糖質や、グルシトール等の糖アルコールを示す。

また、分析対象物と標識試薬との何らかの反応とは、抗原抗体反応のようなリガンドとレセプターとの特異的結合反応、または酵素反応等の任意の特異的な反応を示す。

また、標識試薬保持部位 1 3 が保持する標識試薬は、金コロイド等の金属ゾルや、非金属ゾル、染料ゾル、着色粒子、色素、酵素、タンパク質等を示す。

第 4 図は、本発明の実施の形態 2 による縦型バイオセンサを、試料添加部側からみた斜視図であり、第 5 図は、本発明の実施の形態 2 による縦型バイオセンサを、吸水部側からみた斜視図である。

次に、本実施の形態 2 によるバイオセンサを用いた血液成分分析方法について説明する。

まず、全血や細菌溶液等の細胞成分を含む液体試料が試料添加部 1 2 に添加され、この添加された液体試料が収縮剤保持部位 1 8 に達すると、収縮剤保持部位 1 8 に保持されている収縮剤が、液体試料の浸透により溶解され、細胞成分を収縮させる。

次いで、収縮された細胞成分が混在する液体試料が、標識試薬保持部位 1 3 に達すると、該標識試薬保持部位 1 3 に保持された標識試薬が、液体試料の浸透により溶解され、収縮された細胞成分は、標識試薬保持部位 1 3 における不織布やガラス繊維濾紙の繊維に絡みつき、分離される。これにより液体成分は、素早く

5 反応層 1 4 に浸透する。

そして、反応層 1 4 の領域上の特異的タンパク質固定化部 1 5 で、標識試薬保持部位 1 3 から溶出した標識試薬との反応が行なわれ、このとき、液体試料中に分析対象物が存在すれば、特異的タンパク質固定化部 1 5 に何らかの呈色反応が見られる。

10 最終的に、液体試料は吸水部 1 6 に吸収され反応は終了する。

このように、本実施の形態 2 によるバイオセンサ、及び血液成分分析方法によれば、収縮剤保持部位に保持された細胞収縮剤が、液体試料中の細胞成分を収縮させるようにしたので、下部に積層されている部材の繊維に絡まり分離され、液体試料中の液体成分が素早く反応層に浸透するようになり、全血や細菌溶液を検

15 体としても、コストがかからず、簡便かつ迅速に、高い精度の血液成分分析を行なうことができる。

なお、上記実施の形態 2 によるバイオセンサは、その試料添加部を省き、反応層に直接試料を添加する構成にしてもよい。

第 6 図は、本発明の実施の形態 2 による縦型バイオセンサの試料添加部を省いて、収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにしたものを示す斜視図であり、第 7 図は、本発明の実施の形態 2 による縦型バイオセンサの試料添加部を省いて、収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにしたものを、収縮剤保持部位側からみた斜視図であり、第 8 図は、本発明の実施の形態 2 による縦型バイオセンサの試料添加部を省いて、収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにしたものを、

25 吸水部側からみた斜視図である。

第 6 図ないし第 8 図に示されるように収縮剤保持部位が試料添加部を兼ねるようにすることで、部材数、及び工程数を低減することができる。

また、上記実施の形態 1、及び 2 によるバイオセンサには、ニトロセルロースや不織布あるいはガラス繊維濾紙のような、任意の多孔質性担体で構成されたク

ロマトグラフィー材料が用いられており、一般に、このような材料からなるバイオセンサは、例えば、抗原抗体反応のような任意の特異的反応による測定原理を用いて、ある特定物質を分析検出し、定性または定量する機能を持っている。ここで、上記実施の形態 1、及び 2 では、標識物を用いた抗原抗体反応を例として

5 説明を行なったが、これに限るものではなく、酵素のように反応の前後において何らかの変化が生じるものであれば何を用いるようにしてもよい。

また、本発明のバイオセンサは乾式分析要素であってもよい。ここで示す乾式分析要素とは、バイオセンサを構成する全ての部材、及び担持された試薬が乾燥状態であるものを示す。このように試験片を乾燥状態にすることにより、バイオ

10 センサ全体が乾燥担体であることから、持ち運びが容易であるばかりでなく、保存環境や保存状態を厳密にする必要性がなく、取り扱いが容易で、保存条件を選ばない長期保存が可能である。

また、本発明のバイオセンサはワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片を有するものであってもよい。ここで示すワンステップとは、その測定操作にお

15 いて、全血など細胞成分を含む液体試料の前処理を必要とせず、試験片に液体試料を点着するのみで、液体試料点着の前後に試験片上に液体試料とは異なる展開溶液を用いたり、洗浄操作を行うなどを必要としない操作を示し、免疫クロマトグラフィー試験片とは、クロマト展開する担体上で、抗原抗体反応を利用して液体試料中の被検物質の検出を行うセンサを示す。このように試験片をワンステッ

20 プの免疫クロマトグラフィー試験片とすることにより、全血などの細胞成分を含む液体試料を予め前処理する必要性がなく、免疫反応を利用することで、測定対象に対する抗体あるいは抗原を入手することで広い分野における測定対象が測定でき、全血等の細胞成分を含む液体試料を用いた場合において、簡易迅速な測定が可能となる。

25 (実施例)

以下の実施例により、本発明を実施する方法をさらに詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施例になんら制約されるものではない。

実施例 1.

(クロマトグラフィーを利用した横型バイオセンサによる全血中 hCG の定性)

ニトロセルロース膜中に抗hCG- β 抗体固定化ライン、及び抗hCG- α 抗体と金コロイドとの複合体の広いバンドを含む免疫バイオセンサを製造した。このバイオセンサは、第1図に示されるような形状の横型バイオセンサであり、次のようにして製造した。

5 a) バイオセンサの調製

リン酸緩衝溶液にて希釈して濃度調整をした抗hCG- β 抗体溶液を準備した。この抗体溶液を、溶液吐出装置を用いてニトロセルロース膜上に塗布した。これにより、ニトロセルロース膜上に検出用の抗体固定化ラインが得られた。このニトロセルロース膜を乾燥後、1%スキムミルクを含有するTris-HCl緩衝溶液中に浸漬して30分間緩やかに振った。30分後、Tris-HCl緩衝溶液槽に膜を移動し、10分間緩やかに振った後に、別のTris-HCl緩衝溶液槽にて更に10分間緩やかに振り、膜の洗浄を行なった。2度洗浄を行なった後に、膜を液槽から取り出して、室温で乾燥させた。

金コロイドは、0.01%塩化金酸の還流中の100℃溶液に1%クエン酸溶液を加えることによって調製した。還流を30分間続けた後に、室温放置にて冷却した。0.2Mの炭酸カリウム溶液によって、pH9に調製した前記金コロイド溶液に、抗hCG- α 抗体を加えて数分間攪拌した後に、pH9の10%BSA（牛血清アルブミン）溶液を最終1%になる量だけ加えて攪拌することで、抗体-金コロイド複合体（標識抗体）を調製した。前記標識抗体溶液を4℃、20000Gで50分間遠心分離することによって、標識抗体を単離して、それを洗浄緩衝液（1%BSA・リン酸緩衝液）中に懸濁した後に、前記遠心分離を行なって、標識抗体を洗浄単離した。この標識抗体を洗浄緩衝液で懸濁して、0.8 μ mのフィルタにて濾過した後に、当初の金コロイド溶液量の10分の1に調製して、4℃で貯蔵した。

25 前記標識抗体溶液を溶液吐出装置にセットして、抗hCG- β 抗体固定化乾燥膜上の抗体固定化位置から離れた位置に塗布した後に、膜を乾燥させた。これによって、固定化膜上に標識試薬保持部位が得られた。

0.15Mに調製された塩化カリウム水溶液を、不織布に対して単位面積あたり0.1ml点着した後に、液体窒素にて直ちに凍結し、凍結乾燥を行なう。こ

れによって、塩化カリウムが含浸された収縮剤保持部材が得られた。

こうして調製された標識試薬保持部位を含む抗体固定化膜を、担体支持体上に貼付け、収縮剤保持部材と、試料添加部として不織布を、ガラス繊維濾紙を吸水部として、付け加えてから 0.5 cm 幅の細片に切断して、バイオセンサを作製した。

b) 試料の調製

抗凝固剤としてヘパリンを加えた人の血液を、ヘマトクリット値 45% になるように調製した。この血液に既知濃度の hCG 溶液を加えることにより、さまざまな既知濃度の hCG 溶液を調製した。

c) バイオセンサ上の呈色度合の測定

バイオセンサ上の試料添加部に hCG を含む全血を 150 μ l 程度添加して、吸水部方向へと展開処理して、抗原抗体反応をさせて抗体固定化部における呈色反応を行なった。このバイオセンサへの試料添加から 5 分後の呈色状況を目視にて確認した。さらに、バイオセンサ上の反応層 2 cm をクロマト下流側まで浸透するために要した時間を測定した。

第 9 図は、本発明の実施例 1 による横型バイオセンサの、収縮剤濃度の変化による反応層上の溶液浸透速度を示す図である。具体的には、KC1 濃度を 0.01 M、0.1 M、0.15 M、5 M に変更し、それぞれの濃度の KC1 溶液が担持された収縮剤保持部位 3 をセンサに組み込み、ヘマトクリット値 45% の血液を添加した時の、血液が反応層を 2 cm 浸透するのに要した時間を示しており、KC1 を全く含まない場合では、浸透に約 1 時間を要したが、KC1 濃度が 0.01 M、0.1 M、0.15 M と増大すると浸透時間は短縮されているのがわかる。

以上の結果から、本実施例 1 による横型バイオセンサに設けられた、細胞収縮剤を保持する領域は、反応層上の浸透速度の短縮に、大きく関与していることがわかる。

なお、細胞収縮剤の濃度を 0.1 M ~ 0.5 M に設定することで、細胞成分を最適な大きさに収縮させることができ、この結果、全血を担体上で目詰まりすることなく迅速に浸透させることができる。

また、本実施例 1 では、細胞収縮剤を担持する担体（本実施例 1 では、塩化カリウム水溶液）を凍結乾燥によって乾燥させるものとしたので、細胞収縮剤の結晶が、きめ細かく溶解しやすい状態となり、短時間で細胞成分を収縮させることができる。

- 5 また、本実施例 1 では、細胞収縮剤を担持する担体を凍結乾燥によって乾燥させるものとしたがこれに限るものではなく、自然乾燥または風乾によって乾燥させてもよい。これにより、細胞収縮剤の変性等が少なくなり、効率よく細胞成分を収縮させることができる。さらに、細胞収縮剤を担持する担体を、熱乾燥によって乾燥させてもよい。これにより、短時間での細胞収縮剤の乾燥が可能となり、
- 10 製造工程の簡易化が可能となる。

- また、本記実施例 1 によるバイオセンサには、ニトロセルロースやガラス繊維濾紙のような、任意の多孔質性担体で構成されたクロマトグラフィー材料が用いられており、一般に、このような材料からなるバイオセンサは、例えば、抗原抗体反応のような任意の特異的測定原理を用いて、ある特定物質を分析検出し、定性または定量する機能を持っている。ここで、本実施例 1 では、標識物を用いた
- 15 抗原抗体反応を例として説明を行なったが、これに限るものではなく、酵素のように反応の前後において何らかの変化が生じるものであれば何を用いるようにしてもよい。

- また、試料添加部として不織布を、ガラス繊維濾紙を吸水部とした複数の多孔質性担体で構成された試験片を例に挙げたが、不織布とガラス繊維濾紙を取り除き、多孔質担体上に固定化された抗体固定化部と標識試薬が溶出可能なように保持された標識試薬保持部位、細胞収縮剤が溶出可能なように保持された収縮剤保持部位が備えられた単層の構成をとってもよい。
- 20

実施例 2.

- 25 (クロマトグラフィーを利用した縦型バイオセンサを用いた全血中 hCG の定性)

抗 hCG- β 抗体固定化領域を含むニトロセルロースメンブレン膜と、抗 hCG- α 抗体と金コロイドとの複合体からなる標識物を含む標識試薬保持部位と、添加された血液中の血球を収縮させる血球収縮剤を含む収縮剤保持部位からなる

バイオセンサを製造した。このバイオセンサは、第3図に示されるような形状の縦型バイオセンサである。このバイオセンサは、次のようにして製造した。

a) バイオセンサの調製

試料添加部として、ガラス繊維濾紙GA100（アドバンテック製）を用意した。

収縮剤保持部位は、NaCl水溶液を作製し、この水溶液をガラス繊維濾紙GA100（アドバンテック製）に140 μ l点着し、直ちに液体窒素で凍結後、凍結乾燥を行なった。これにより、収縮剤保持部位が調製された。

金コロイドは、0.01%塩化金酸の還流中の100℃溶液に1%クエン酸溶液を加えることによって調製した。還流を30分間続けた後に、冷却した。0.2Mの炭酸カリウム溶液によって、pH9に調製した前記金コロイド溶液に、抗hCG- α 抗体を加えて数分間攪拌した後に、pH9の10%BSA（牛血清アルブミン）溶液を最終1%になる量だけ加えて攪拌することで、抗体金コロイド複合体（標識抗体）を調製した。前記標識抗体溶液を4℃、20000Gで50分間遠心分離することによって、標識抗体を単離して、それを洗浄緩衝液（1%BSA・リン酸緩衝液）中に懸濁した後に、前記遠心分離を行なって、標識抗体を洗浄単離した。この標識抗体を洗浄緩衝液で懸濁して、0.8 μ mのフィルタにて濾過した後に、当初の金コロイド溶液量の10分の1に調製して、4℃で貯蔵した。

この金コロイド溶液をガラス繊維濾紙GA100（アドバンテック製）に140 μ l点着し、直ちに液体窒素で凍結後、凍結乾燥を行なった。これにより、標識試薬保持部位が調製された。

リン酸緩衝溶液にて希釈して濃度調整をした抗hCG- β 抗体溶液を準備した。この抗体溶液を溶液吐出装置を用いて、ニトロセルロース膜上に塗布した。これにより、ニトロセルロース膜上に検出用の抗体固定化領域が得られた。このニトロセルロース膜を乾燥後、1%BSA・0.5%スキムミルクを含有するTris-HCl緩衝溶液中に浸漬して30分間緩やかに振った。30分後、Tris-HCl緩衝液槽に膜を移動し、10分間緩やかに振った後に、別のTris-HCl緩衝液槽にて更に10分間緩やかに振り、膜の洗浄を行なった。2度

洗浄を行なった後に、膜を液槽から取り出して、室温で乾燥させて、特異的タンパク質固定化部を持つ反応層とした。

吸水部は、反応層上の結果が判定できるよう結果確認窓を設けたガラス繊維濾紙GA200（アドバンテック製）を用意した。

- 5 こうして調製された各部材を、第3図に示されるように積層し、ケースをかぶせてバイオセンサとした。

b) 試料の調製

抗凝固剤としてヘパリンを加えた人の血液を、ヘマトクリット値45%になるように調製した。この血液に既知濃度のhCG溶液を加えることにより、さまざまな既知濃度のhCG溶液を調製した。

10

c) 測定

上記のように組立てた分析装置の試料添加部にhCGを含む血液を200 μ l添加して、積層されたバイオセンサの下部方向へと展開処理して、抗原抗体反応をさせて抗体固定化部における呈色反応を行なった。このバイオセンサへの試料

15 添加から3分後の呈色状況を、バイオセンサ下部にある結果確認窓から目視にて確認を行なった。さらに測定が終了したバイオセンサを分解し、反応層への血球付着状況を確認した。

第10図は、本発明の実施例2による縦型バイオセンサの、収縮剤濃度の変化による反応層への血球付着率を示す図である。具体的には、NaCl濃度を50

20 mM、150mM、200mM、250mM、300mM、350mMに変更し、それぞれの濃度のNaCl溶液が担持された収縮剤保持部位をセンサに組み込み、ヘマトクリット値45%の血液を添加した時の、反応層に血球が到達した回数の確率を示しており、NaClを全く含まない場合では、100%の割合で反応層への血球の付着がみられたが、NaCl濃度が50mMから増大するに従って、

25 反応層への血球付着率は徐々に低下し、350mMでは血球は全く付着しなくなったことがわかる。

以上の結果から、本実施例2による横型バイオセンサに設けられた、細胞収縮剤を保持する領域は、検体中の細胞成分の分離効率の向上に、大きく寄与していることがわかる。

なお、細胞収縮剤の濃度を 0.05M~0.3M に設定することで、細胞成分を最適な大きさに収縮させることができ、この結果、細胞成分分離効率を向上させることができる。

5 また、本実施例 2 では、細胞収縮剤を担持する担体（本実施例 2 では、塩化ナトリウム水溶液）を凍結乾燥によって乾燥させるものとしたので、細胞収縮剤の結晶が、きめ細かく溶解しやすい状態となり、短時間で細胞成分を収縮させることができる。

10 また、本実施例 2 では、細胞収縮剤を担持する担体を凍結乾燥によって乾燥させるものとしたがこれに限るものではなく、自然乾燥または風乾によって乾燥させてもよい。これにより、細胞収縮剤の変性等が少なくなり、効率よく細胞成分を収縮させることができる。さらに、細胞収縮剤を担持する担体を、熱乾燥によって乾燥させてもよい。これにより、短時間での細胞収縮剤の乾燥が可能となり、製造工程の簡易化が可能となる。

15 また、本実施例 2 によるバイオセンサは、金コロイドを標識物として用いているが、固定化抗体に酵素を標識しておき、酵素反応による呈色反応を生じうる試薬を標識試薬として用いるようにしてもよい。

20 また、本実施例 2 によるバイオセンサには、ニトロセルロースやガラス繊維濾紙のような、任意の多孔質性担体で構成されたクロマトグラフィー材料が用いられており、一般に、このような材料からなるバイオセンサは、例えば、抗原抗体反応のような任意の特異的測定原理を用いて、ある特定物質を分析検出し、定性または定量する機能を持っている。ここで、本実施例 2 では、標識物を用いた抗原抗体反応を例として説明を行なったが、これに限るものではなく、酵素のように反応の前後において何らかの変化が生じるものであれば何を用いるようにしてもよい。

25

産業上の利用可能性

以上のように本発明に係るバイオセンサ、及び血液成分分析方法は、全血を検体としても、コストがかからず、予め血液に何らかの処理を施す必要性や、検体溶液を展開するための展開溶液の必要性のない、簡便かつ迅速に、高い精度の血

液成分分析を行うことができものであり、特にワンステップのバイオセンサ、及び血液成分の分析方法に適している。

請求の範囲

1. 単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサにおいて、
- 5 上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上流側の少なくとも一部に、細胞収縮剤を担持した、
ことを特徴とするバイオセンサ。
2. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
添加する液体試料は、全血である、
- 10 ことを特徴とするバイオセンサ。
3. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
添加する液体試料は、細菌を含む溶液である、
ことを特徴とするバイオセンサ。
4. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
- 15 上記細胞収縮剤は、無機塩である、
ことを特徴とするバイオセンサ。
5. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
上記細胞収縮剤は、アミノ酸である、
ことを特徴とするバイオセンサ。
- 20 6. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
上記細胞収縮剤は、糖類である、
ことを特徴とするバイオセンサ。
7. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
上記細胞収縮剤を担持する担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させた、
- 25 ことを特徴とするバイオセンサ。
8. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
上記細胞収縮剤を担持する担体を、凍結乾燥によって乾燥させた、
ことを特徴とするバイオセンサ。
9. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、

上記細胞収縮剤を担持する担体を、熱乾燥によって乾燥させた、
ことを特徴とするバイオセンサ。

10. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片である、
5 ことを特徴とするバイオセンサ。

11. 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
上記バイオセンサが乾式分析要素である、
ことを特徴とするバイオセンサ。

12. 単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を有しクロマト
10 グラフィーを利用したバイオセンサを用いる血液成分分析方法において、
上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上
流側の少なくとも一部の、細胞収縮剤を担持した領域で細胞成分を収縮させ、収
縮した細胞成分を分離する、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

13. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
添加する血液試料は、全血である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

14. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、無機塩である、
20 ことを特徴とする血液成分分析方法。

15. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、アミノ酸である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

16. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
25 上記細胞収縮剤は、糖類である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

17. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

18. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、凍結乾燥によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
19. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
5 上記細胞収縮剤を担持した担体を、熱乾燥によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
20. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤の濃度は、0.05～0.3Mである、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
- 10 21. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
22. 請求の範囲第12項に記載の血液成分分析方法において、
上記バイオセンサが乾式分析要素である、
15 ことを特徴とする血液成分分析方法。
23. 単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサを用いる血液成分分析方法において、
上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上
流側の少なくとも一部の、細胞収縮剤を担持した領域で細胞成分を収縮させある
20 いは収縮しながら、収縮した細胞成分が混在する状態でクロマト展開する、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
24. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、
添加する血液試料は、全血である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
- 25 25. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、無機塩である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
26. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、アミノ酸である、

ことを特徴とする血液成分分析方法。

27. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、

上記細胞収縮剤は、糖類である、

ことを特徴とする血液成分分析方法。

5 28. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、

上記細胞収縮剤を担持した担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させる、

ことを特徴とする血液成分分析方法。

29. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、

上記細胞収縮剤を担持した担体を、凍結乾燥によって乾燥させる、

10 ことを特徴とする血液成分分析方法。

30. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、

上記細胞収縮剤を担持した担体を、熱乾燥によって乾燥させる、

ことを特徴とする血液成分分析方法。

31. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、

15 上記細胞収縮剤の濃度は、0.1～5.0Mである、

ことを特徴とする血液成分分析方法。

32. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、

上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片である、

ことを特徴とする血液成分分析方法。

20 33. 請求の範囲第23項に記載の血液成分分析方法において、

上記バイオセンサが乾式分析要素である、

ことを特徴とする血液成分分析方法。

補正書の請求の範囲

[2001年10月4日(04.10.01)国際事務局受理：出願当初の請求の範囲
11-34は補正された；新しい請求の範囲10が加えられた；
他の請求の範囲は変更なし。(3頁)]

上記細胞収縮剤を担持する担体を、熱乾燥によって乾燥させた、
ことを特徴とするバイオセンサ。

10. (追加) 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
上記細胞収縮剤の濃度が、0.05～5.0Mである、
5 ことを特徴とするバイオセンサ。
11. (補正後) 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片である、
ことを特徴とするバイオセンサ。
12. (補正後) 請求の範囲第1項に記載のバイオセンサにおいて、
10 上記バイオセンサが乾式分析要素である、
ことを特徴とするバイオセンサ。
13. (補正後) 単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を
有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサを用いる血液成分分析方法にお
いて、
15 上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上
流側の少なくとも一部の、細胞収縮剤を担持した領域で細胞成分を収縮させ、収
縮した細胞成分を分離する、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
14. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
20 添加する血液試料は、全血である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
15. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、無機塩である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
- 25 16. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、アミノ酸である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
17. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、糖類である、

ことを特徴とする血液成分分析方法。

18. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

5 19. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、凍結乾燥によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

20. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、熱乾燥によって乾燥させる、

10 ことを特徴とする血液成分分析方法。

21. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤の濃度は、0.05～0.3Mである、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

22. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
15 上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

23. (補正後) 請求の範囲第13項に記載の血液成分分析方法において、
上記バイオセンサが乾式分析要素である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

20 24. (補正後) 単層または複数層の多孔質性材料からなる、試薬保持部位を
有しクロマトグラフィーを利用したバイオセンサを用いる血液成分分析方法にお
いて、

上記試薬保持部位の少なくとも一部、または該試薬保持部位よりもクロマト上
流側の少なくとも一部の、細胞収縮剤を担持した領域で細胞成分を収縮させある

25 いは収縮しながら、収縮した細胞成分が混在する状態でクロマト展開する、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

25. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
添加する血液試料は、全血である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

26. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、無機塩である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
27. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
5 上記細胞収縮剤は、アミノ酸である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
28. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤は、糖類である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
- 10 29. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、自然乾燥または風乾によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
30. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、凍結乾燥によって乾燥させる、
15 ことを特徴とする血液成分分析方法。
31. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記細胞収縮剤を担持した担体を、熱乾燥によって乾燥させる、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
32. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
20 上記細胞収縮剤の濃度は、0.1～5.0Mである、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
33. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記バイオセンサがワンステップの免疫クロマトグラフィー試験片である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。
- 25 34. (補正後) 請求の範囲第24項に記載の血液成分分析方法において、
上記バイオセンサが乾式分析要素である、
ことを特徴とする血液成分分析方法。

条約 19 条 (1) に基づく説明書

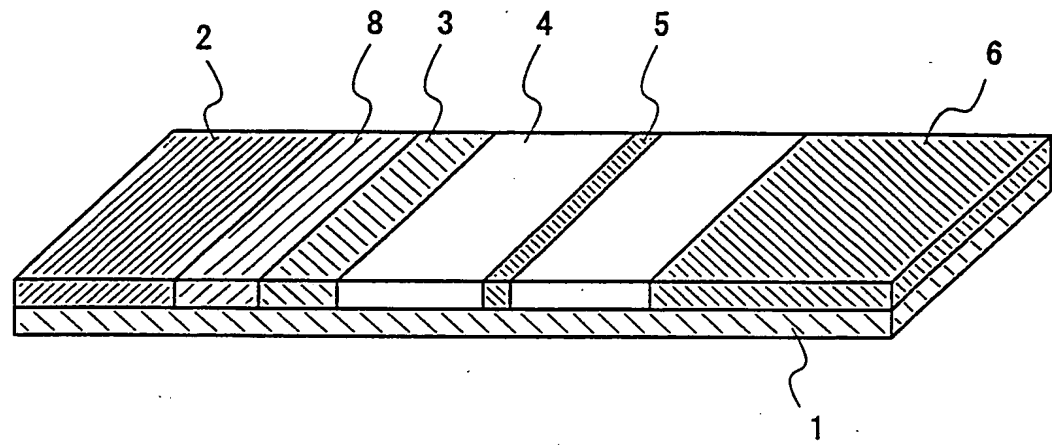
請求の範囲第 10 項は、細胞成分を最適な大きさに収縮させることによって、細胞成分分離効率を向上させることができることを明確にした。

- 5 引用例 (JP 1-262470) は、赤血球を含む血液中の特定成分を定量分析する際に、特定量の塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを多孔質展開層に含むことを特徴とし、引用例 (JP 6-94718) は、細胞成分と液性成分の展開速度が相異なる展開支持体を用いたことを特徴とし、引用例 (JP 11-505327) は、血液の液体部分を透過するが血液の細胞成分を補足することができる多孔性物質製のパッドを備えたことを特徴とする。
- 10

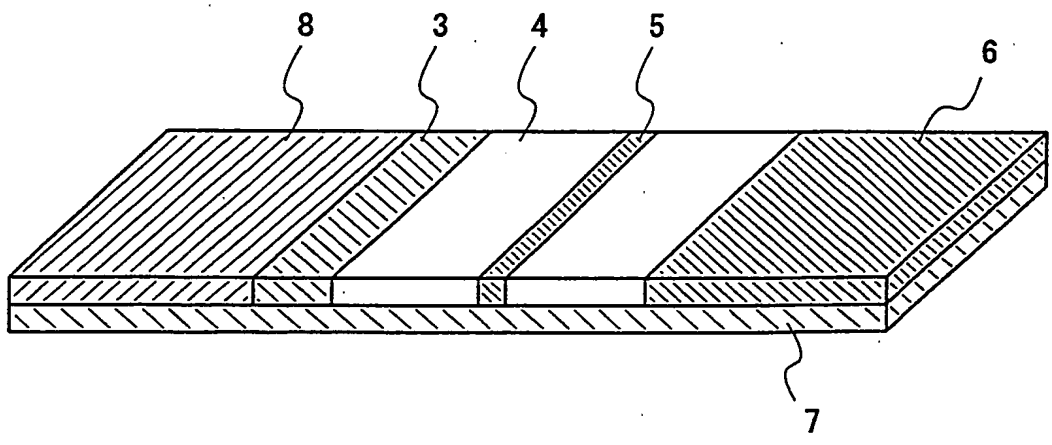
本発明は、添加された液体試料中の細胞成分が、バイオセンサに担持した細胞収縮剤と接触することによって収縮される点で、上記引用例とは異なる。すなわち、本発明は、全血や細菌溶液を検体としても、クロマト担体上を細胞成分が効率よく、かつ、展開溶液を加えなくとも十分に浸透することができる効果を得る。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第1図

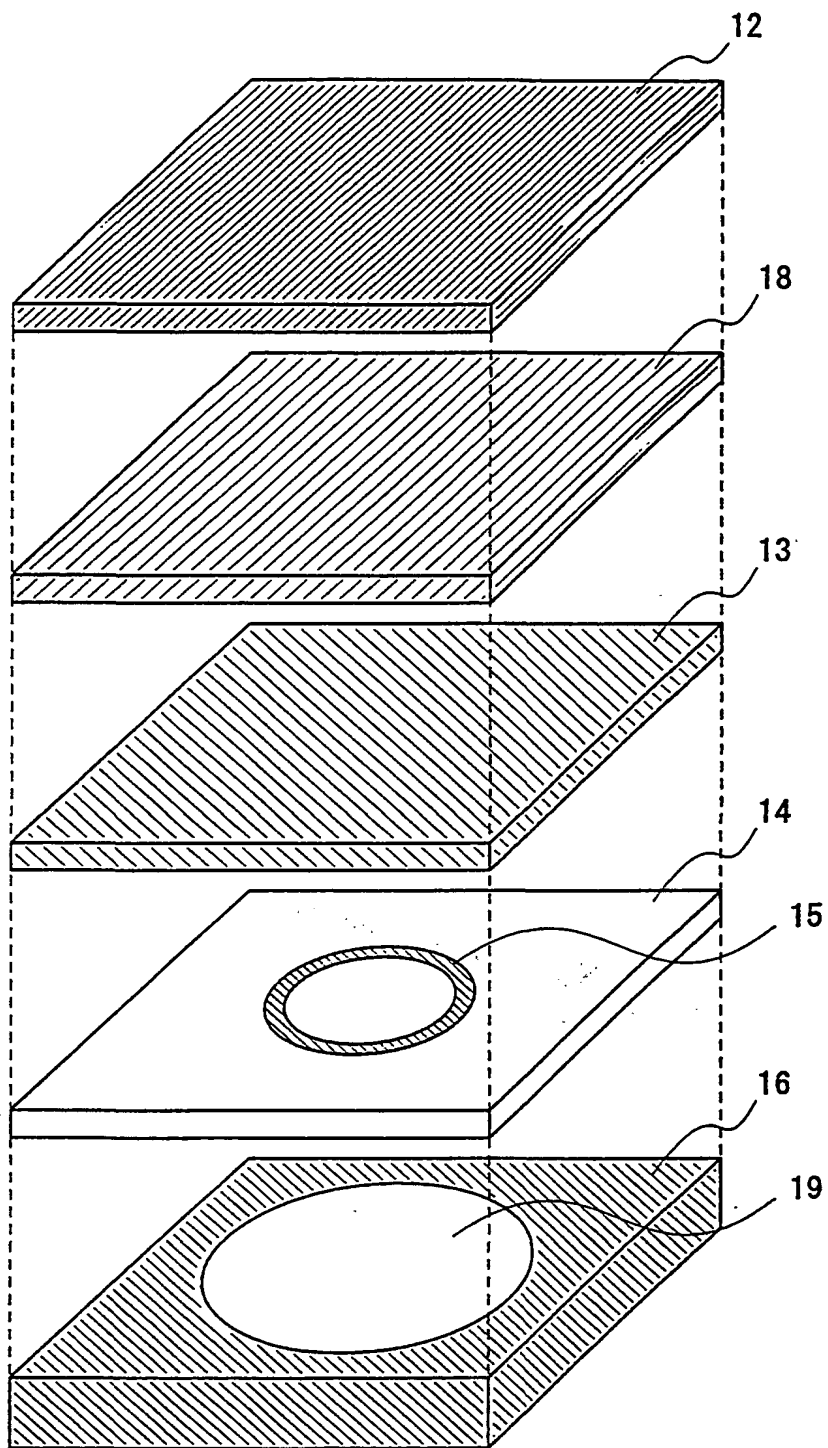


第2図



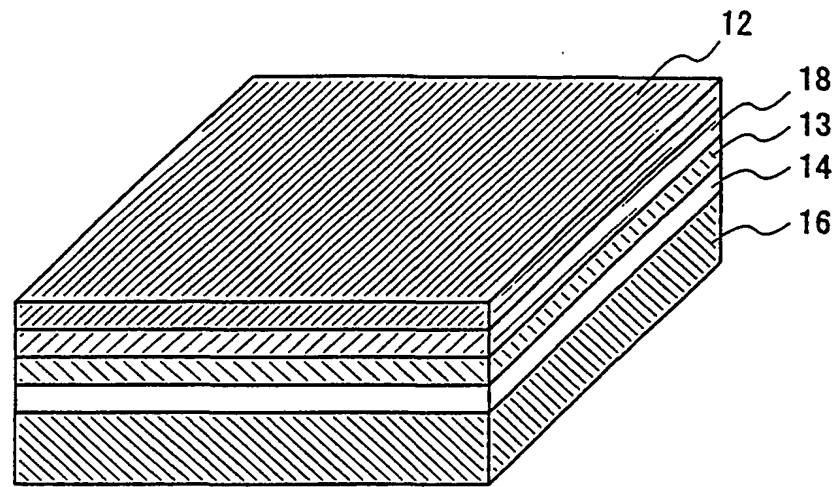
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第3図

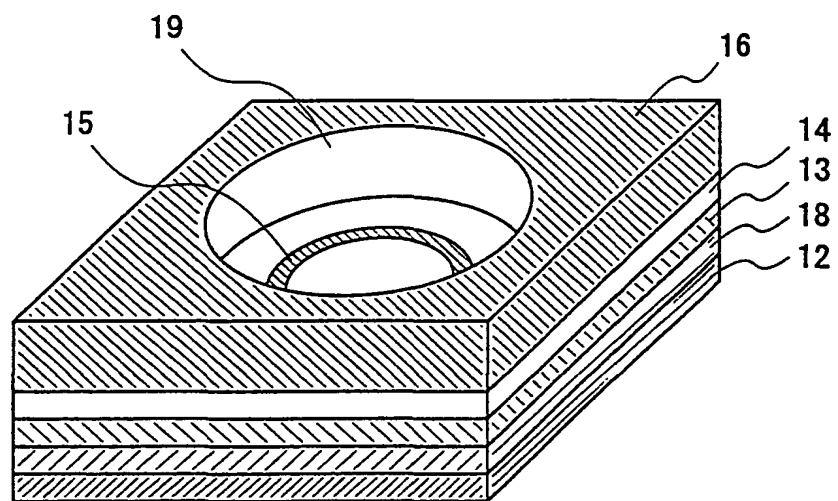


THIS PAGE BLANK (USPTO)

第4図

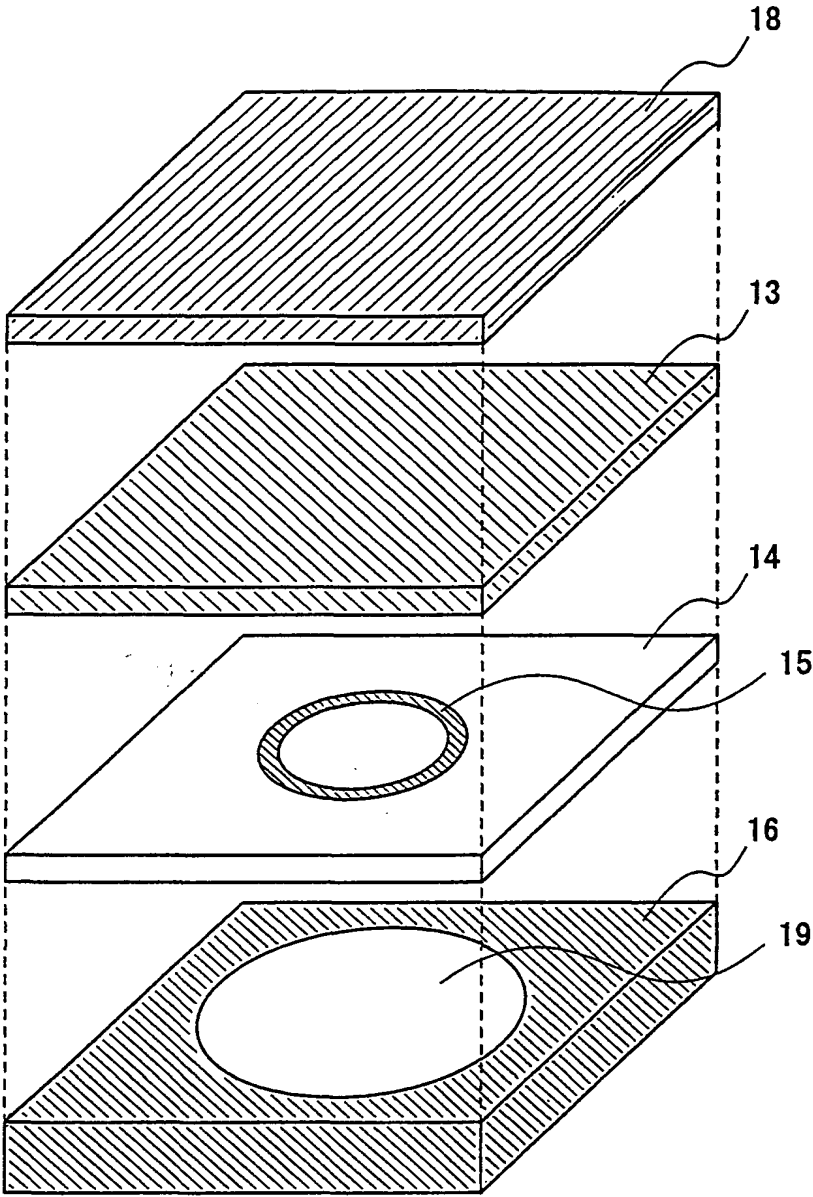


第5図



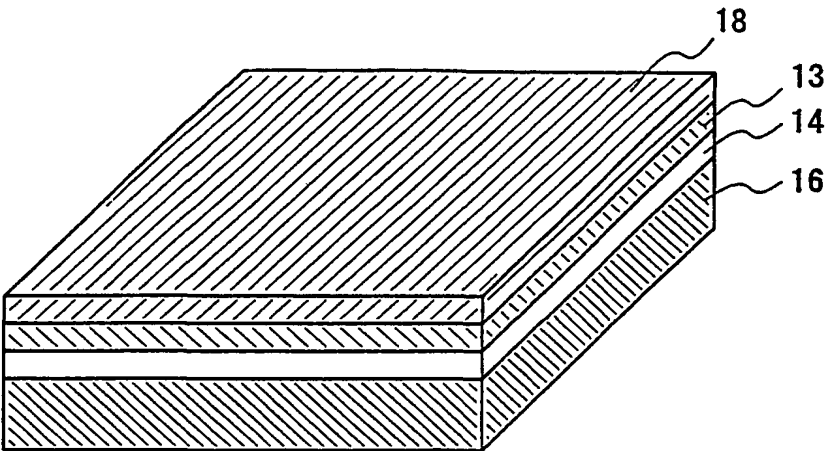
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第6図

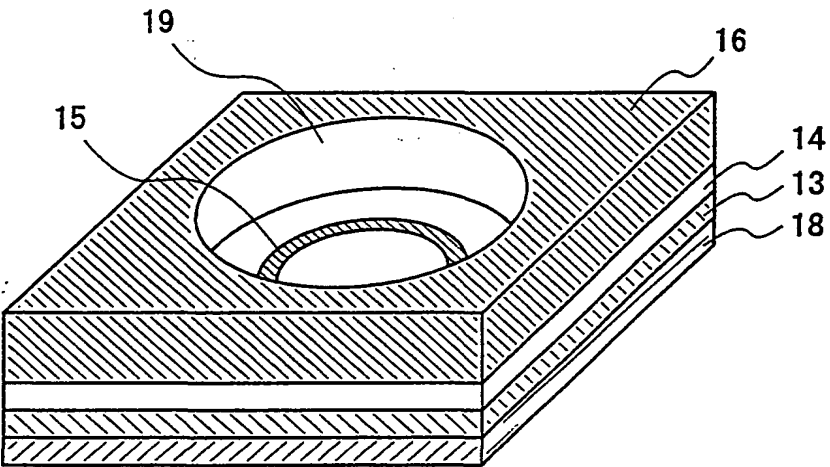


THIS PAGE BLANK (USPTO)

第7図

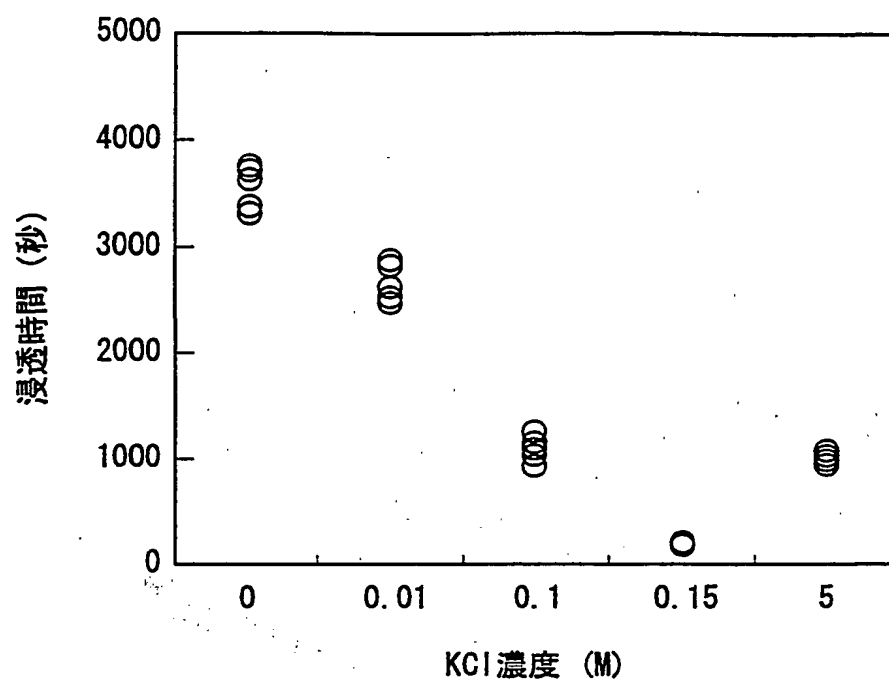


第8図

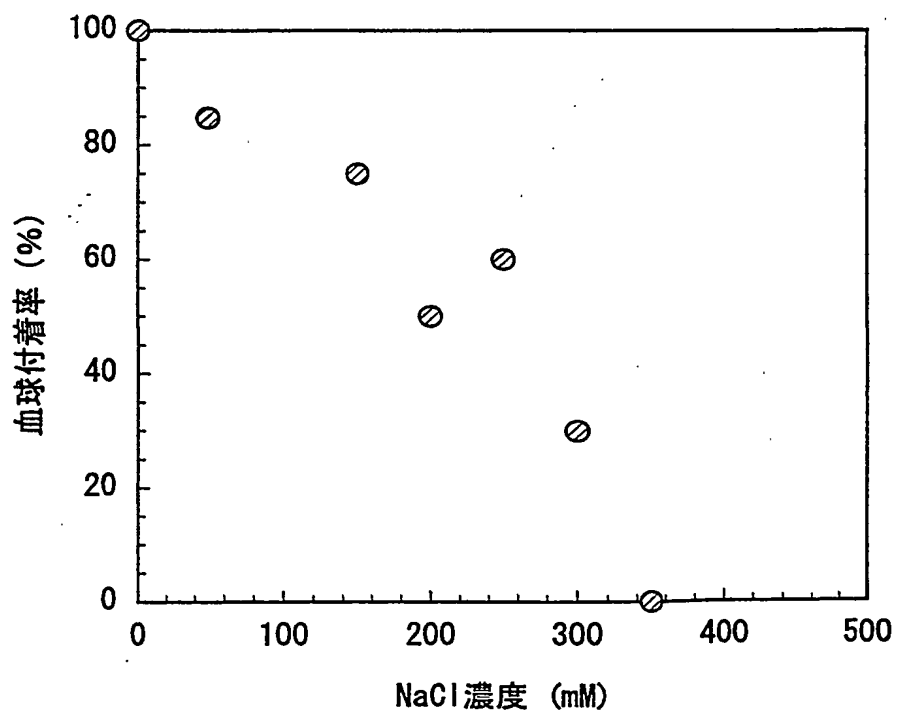


THIS PAGE BLANK (USPTO)

第9図



第10図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.

PCT/JP01/04649

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/543, 31/22, 30/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/543, 31/22, 30/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1992-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2001
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2001	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 1-262470 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 19 October, 1989 (19.10.89) (Family: none)	1-33
A	JP 6-94718 A (Daiichi Radioisotope Laboratories, Ltd.), 08 April, 1994 (08.04.94) (Family: none)	1-33
A	JP 11-505327 A (SmithKline Diagnostics, Inc.), 18 May, 1999 (18.05.99), & EP 832430 A	1-33

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 July, 2001 (26.07.01)

Date of mailing of the international search report
07 August, 2001 (07.08.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543, 31/22, 30/88

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543, 31/22, 30/88

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1992-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 1-262470 A (富士写真フイルム株式会社) 19. 10月. 1989 (19. 10. 89) (ファミリーなし)	1-33
A	JP 6-94718 A (株式会社第一ラジオアイソトープ研究 所) 8. 4月. 1994 (08. 04. 94) (ファミリーなし)	1-33
A	JP 11-505327 A (スミスクライン ダイアグノステ ィックス インコーポレイテッド) 18. 5月. 1999 (18. 05. 99) &EP 832430 A	1-33

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 07. 01

国際調査報告の発送日

07.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之



2J 9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

THIS PAGE BLANK (USPTO)